

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 41 42 552 A 1**

21 Aktenzeichen: P 41 42 552.9
22 Anmeldetag: 21. 12. 91
43 Offenlegungstag: 24. 6. 93

51 Int. Cl.⁵:
C 07 K 15/28
C 12 N 5/18
C 12 N 9/99
C 12 N 5/00
A 61 K 39/395
A 61 K 37/64
// C12N 9/16, C12Q
1/44, G01N 33/53

DE 41 42 552 A 1

71 Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, DE

72 Erfinder:
Scheuer, Werner, Dipl.-Biochem. Dr., 8122 Penzberg,
DE; Hübner-Parajsz, Christa, Dipl.-Chem. Dr., 8132
Tutzing, DE; Tibes, Ulrich, Prof. Dr., 6000 Frankfurt,
DE

54 Monoklonale Antikörper gegen die Typ I Phospholipase A₂ als entzündungshemmendes Therapeutikum

57 Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen die Typ-I-Phospholipase A₂, die eine hemmende Wirkung auf die enzymatische Aktivität der Phospholipase A₂ aufweisen, sowie die Verwendung dieser Antikörper zur Herstellung eines entzündungshemmenden Therapeutikums, das sich insbesondere zur Anwendung bei akuter Pankreatitis eignet.

DE 41 42 552 A 1

Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A₂, sowie deren Verwendung zur Herstellung eines entzündungshemmenden Therapeutikums, das sich insbesondere zur Anwendung bei akuter Pankreatitis eignet.

Für die akute Pankreatitis existiert weder eine kausale noch eine symptomatische Therapie (The Merck Manual of Diagnosis and Therapy 15 (1987), Seite 763—767). Pathogenetische Grundlage der akuten Pankreatitis ist eine Autolyse des Pankreas. Hierbei wird der Phospholipase A₂ eine entscheidende Funktion zugeschrieben. Sie wirkt zum einen direkt lysierend auf die Zellmembran und setzt dabei aus Membranphospholipiden Arachidonsäure frei. Die Metabolite der Arachidonsäure (Prostaglandine und Leukotriene) sind wesentlicher Bestandteil der Entzündungsreaktion.

Die Phospholipase A₂ kommt in zwei Formen vor. Die als Typ I bezeichnete Phospholipase A₂ wird im wesentlichen im Pankreasgewebe gefunden und spielt bei der akuten Pankreatitis eine entscheidende Rolle. Dagegen ist die Typ II Phospholipase A₂ in vielen verschiedenen Geweben anzutreffen.

In der EP-A 02 48 597 werden niedermolekulare Hemmstoffe der Phospholipase A₂ beschrieben, die eine entzündungshemmende Wirkung bei der Maus aufweisen. Für eine etwa 80%ige Hemmung ist jedoch eine Applikation von 200—400 µg dieser Verbindungen notwendig. Bei derart hohen Dosierungen schränken Nebenwirkungen dieser niedermolekularen Inhibitoren deren therapeutische Anwendbarkeit deutlich ein. Diesen Nachteil weist auch der in der JP 0 88 193 beschriebene Inhibitor der Phospholipase A₂ auf, der mit einer täglichen Dosierung von 100 bis 1000 mg bei erwachsenen Patienten zur Therapie einer Pankreatitis vorgeschlagen wird. Die in der EP-A 04 05 864 beschriebenen Phospholipase A₂-Inhibitoren aus dem Mikroorganismus *Circinotrichum falcatisporum* weisen für die Hemmung von gereinigter Rattenphospholipase A₂ IC₅₀-Werte von 17,5 bis über 300 µg/ml auf und müßten somit bei einer therapeutischen Anwendung ebenfalls sehr hoch dosiert werden.

Als weiterer Inhibitor der Phospholipase A₂ weist auch das 37 kD große Lipocortin eine entzündungshemmende Wirkung auf (B. Wallner et al., Nature 320 (1986), 77—81). Wegen seiner geringen Stabilität eignet sich Lipocortin jedoch nicht für eine therapeutische Verwendung. In der EP-A 03 27 334 werden daher 15—26 Aminosäuren große Peptide beschrieben, die eine hemmende Wirkung auf die Phospholipase A₂ aufweisen. Lediglich bei einem dieser Peptide liegt jedoch der IC₅₀-Wert unter 10 µg/ml. Es wird jedoch nicht gezeigt, daß dieses Peptid aus 16 ungeschützten Aminosäuren eine höhere Stabilität als Lipocortin aufweist.

Von K. Takayama et al. (Biochem. Biophys. Res. Comm. 167 (1990), 1309—1315) werden monoklonale Antikörper gegen die menschliche Phospholipase A₂ aus der Synovialflüssigkeit beschrieben, die jedoch nicht an die Phospholipase A₂ aus dem Pankreas binden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, einen Hemmstoff für die Phospholipase A₂ zur Verfügung zu stellen, dessen inhibitorische Wirkung die Verwendung dieses Hemmstoffs als Therapeutikum gegen die akute Pankreatitis ermöglicht.

Diese Aufgabe wird gelöst durch monoklonale Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A₂, die bei einer Konzentration von weniger als 10 µg/ml eine minde-

stens 50%ige Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirken.

Bevorzugt sind solche monoklonalen Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A₂, die bei einer Konzentration von weniger als 1 µg/ml, besonders bevorzugt solche, die bei einer Konzentration von weniger als 100 ng/ml eine mindestens 50%ige Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirken.

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind monoklonale Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A₂, die in äquivalenter Weise an die Typ I-Phospholipase A₂ bindefähig sind, wie die aus den Zelllinien DSM ACC2026 und/oder DSM ACC2025 erhältlichen monoklonalen Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A₂.

Unter dem Begriff "in äquivalenter Weise bindefähige Antikörper" werden Antikörper verstanden, bei denen eine Epitopüberlappung mit dem definierten bekannten Antikörper nachweisbar ist. Diese Epitopüberlappung kann mit Hilfe eines kompetitiven Testsystems leicht nachgewiesen werden. Dazu wird zum Beispiel mit Hilfe eines Enzymimmunoassays überprüft, in wie weit ein Antikörper mit dem bekannten Antikörper um die Bindung an ein definiertes Antigen bzw. ein spezielles Epitop konkurriert. Dazu inkubiert man das entsprechende Antigen mit dem bekannten monoklonalen Antikörper in markierter Form und einem Überschuß des in Betracht gezogenen Antikörpers. Durch Immobilisierung der gebildeten Komplexe, Trennung der festen von der flüssigen Phase und Nachweis der gebundenen Markierung in einer der beiden Phasen, kann dann leicht festgestellt werden, in wie weit der in Betracht gezogene Antikörper den definierten Antikörper aus der Bindung verdrängen kann. Ist eine Verdrängung von mindestens 50% bei 10⁵-fachen Überschuß gegeben, so liegt eine Epitopüberlappung vor.

Besonders bevorzugt sind die monoklonalen Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase I, die aus den Zelllinien DSM ACC2026 und/oder DSM ACC2025 erhältlich sind.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind die Zelllinien DSM ACC2026 und/oder DSM ACC2025.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen die Typ I-Phospholipase A₂, die bei einer Konzentration von weniger als 10 µg/ml eine mindestens 50%ige Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirken, bei dem man mit gereinigter Phospholipase A₂ immunisiert und nach Immortalisieren von Milzzellen der immunisierten Tiere diejenigen immortalisierten Zellen kloniert, deren Kulturüberstand eine entsprechende Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirkt und Isolierung der von diesen Klonen produzierten monoklonalen Antikörper nach bekannten Verfahren.

Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen die Typ I-Phospholipase A₂, die bei einer Konzentration von weniger als 1 µg/ml, besonders bevorzugt bei einer Konzentration von weniger als 100 ng/ml eine mindestens 50%ige Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirken, bei dem man mit gereinigter Phospholipase A₂ immunisiert und nach Immortalisieren von Milzzellen der immunisierten Tiere diejenigen immortalisierten Zellen kloniert, deren Kulturüberstand eine entsprechende Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirkt und Isolierung der von diesen Klonen produzierten monoklonalen Anti-

körpern nach bekannten Verfahren.

Die Immunisierung wird in den hierfür üblicherweise verwendeten Tieren wie z. B. Mäusen oder Ratten durchgeführt. Vorzugsweise werden Mäuse verwendet.

Die Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere erfolgt vorzugsweise durch Fusionierung mit der Myelomzelllinie P3X63-Ag 8.653 (ATCC CRL 1580) gemäß der Methode nach J. of Imm. Meth. 39 (1980), 285–308. Daneben können aber auch andere, dem Fachmann geläufige Verfahren zur Immortalisierung der Milzzellen (z. B. EBV-Transformation) verwendet werden.

Zur Klonierung werden die Zellen zum Beispiel mittels eines fluoreszenzaktivierten Zellsorters vereinzelt. Zum Nachweis von immortalisierten Zellen, die den gewünschten Antikörper gegen Phospholipase A₂ produzieren, wird eine Probe des Kulturüberstandes in einem ELISA-Test auf Reaktivität mit der Phospholipase A₂ getestet. Um solche Antikörper zu erhalten, welche die enzymatische Aktivität der Phospholipase A₂ hemmen, wird der Kulturüberstand derjenigen Klone, die an die Phospholipase A₂ bindende Antikörper produzieren, zusätzlich auf die Hemmung der Phospholipase A₂-Aktivität in einem enzymatischen Test untersucht.

Diejenigen Klone, deren Kulturüberstand die gewünschte Hemmung der Phospholipase A₂-Aktivität ergibt, werden expandiert und die von diesen Klonen produzierten Antikörper nach bekannten Verfahren isoliert.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A₂ bereits in sehr geringen Konzentrationen die Phospholipase A₂ hemmen (IC₅₀-Werte unter 10 µg/ml). Sie eignen sich daher besonders zur Herstellung eines Therapeutikums gegen Entzündungserscheinungen, wie z. B. gegen die akute Pankreatitis, Psoriasis oder Sepsis. Neben den vollständigen Antikörpern sind hierfür auch funktionelle Antikörperfragmente wie monoklonale Fab- oder F(ab')-Fragmente, sowie bivalente F(ab')₂-Fragmente geeignet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher die Verwendung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A₂, oder funktioneller Fragmente dieses Antikörpers zur Herstellung eines Therapeutikums, das bei Entzündungserscheinungen, speziell bei akuter Pankreatitis eingesetzt werden kann.

Schließlich beinhaltet die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Formulierung, bestehend aus einem erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A₂ oder funktioneller Derivate dieser Antikörper gegebenenfalls zusammen mit den üblichen pharmazeutischen Träger-, Füll-, Hilfs- und Zusatzstoffen, sowie ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Arzneimittels, das insbesondere zur Therapie der akuten Pankreatitis eingesetzt werden kann.

Die einen erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper gegen die Phospholipase A₂ produzierenden Hybridomzelllinien DSM ACC2026 und DSM ACC2025 wurden am 10.12.1991 bei der Deutschen Sammlung von Zellkulturen und Mikroorganismen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-3300 Braunschweig, hinterlegt.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele in Verbindung mit der Fig. 1 erläutert.

Fig. 1 zeigt die Hemmung der Phospholipase A₂-Aktivität durch die monoklonalen Antikörper DSM ACC2026 (+) und DSM ACC2025 (□).

Beispiel 1

Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen die Typ I-Phospholipase A₂

12 Wochen alte Balb/C-Mäuse werden intraperitoneal mit 50 µg gereinigter Phospholipase A₂ (EC 3.1.1.4, J. Eskola et al., Clin. Chem. 29 (1983), 1777–1780) in komplettem Freund's Adjuvans immunisiert. Zwei nachfolgende Injektionen von jeweils 50 µg werden im Abstand von jeweils einem Monat mit inkomplettem Freund's Adjuvans gegeben. 3 Tage vor der Zellfusion erfolgt eine intravenöse Injektion von weiteren 50 µg in physiologischer Kochsalzlösung.

Die Fusion der Milzzellen der immunisierten Mäuse mit der Myelomzelllinie P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580) erfolgt gemäß einer Modifikation der ursprünglich von Köhler und Milstein beschriebenen Methode (J. of Imm. Meth. 39 (1980), 285–308). Die fusionierten Zellen werden in RPMI 1640 Medium (das 10% FKS, 2 mmol/l L-Glutamin und 1 mmol/l Natriumpyruvat, sowie 0,1 mmol/l Hypoxantin und 10 µmol/l Azaserin enthält) kultiviert.

Positive Primärkulturen (Bestimmung gemäß Beispiel 2 und 3) werden 2 Wochen nach Fusion mit Hilfe eines fluoreszenzaktivierten Zellsorters kloniert. Die Zellen werden dabei einzeln in 96-er Mikrotiterplatten abgelegt.

Beispiel 2

Bestimmung der Spezifität der produzierten Antikörper

Um die Spezifität der Antikörper im Kulturüberstand der Hybridomzellen zu erfassen, wird ein Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) angewendet.

Dazu werden 96-er Mikrotiterplatten mit 100 µl Phospholipase A₂ Antigen (5 µg/ml in Carbonatpuffer, Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 726 559) beschichtet, mit 100 µl Kulturüberstand (1:25 mit PBS (nach Dulbecco und Vogt, J. Exp. Meth. 99 (1954), 167–182) verdünnt) 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und mit 3 × 350 µl PBS/0,05% Tween 20 gewaschen. Nach Zugabe der den Antikörper enthaltenden Probelösung wird eine 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und erneut gewaschen. Danach wird mit POD-markiertem Schaf-anti-Maus-Immunglobulin G (10 mU, Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 13 17 377) 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, mit 3 × 350 µl PBS/0,05% Tween 20 gewaschen und die Nachweisreaktion durch Zugabe von 100 µl ABTS® (1 mg/ml, Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 756 407) in 40 mmol/l Citratpuffer pH 4,4 der 3,25 mmol/l Natriumperborat enthält (Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 12 04 530) ausgelöst. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur werden die Extinktionen in einem ELISA-Reader bei 405 nm bestimmt.

Beispiel 3

Test auf Inhibierung der enzymatischen Aktivität

Humane duodenale Phospholipase A₂ wird mit Tris-puffer (125 mmol/l pH 8,0) in geeigneter Weise verdünnt. 20 µl dieser Enzymlösung wird bei 25°C mit 10 µl der zu untersuchenden Antikörperlösung in verschiedenen Konzentrationen (s. Tab. 1) inkubiert. Anschließend wird 20 µl Substrat (Lecithinemulsion aus der Testkom-

bination "Freie Fettsäuren", Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 10 82 914) zugegeben und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die hierbei durch die Phospholipase A₂-Aktivität freigesetzten Fettsäuren werden mittels der Testkombination "Freie Fettsäuren" (Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 10 82 914) durch Messung der Extinktion gemäß Angaben des Herstellers quantifiziert. Die Ergebnisse sind in %-Hemmung im Vergleich zur Enzymaktivität ohne Antikörper in der folgenden Tabelle 1, sowie in Fig. 1, dargestellt (jeweils Mittelwerte aus 3 Bestimmungen).

Tabelle 1

Probe	Konz (µg/ml)	%-Hemmung
DSM ACC2025	100	97
	10	93
	1	86
	0,1	56
	0,01	16
DSM ACC2026	100	97
	10	94
	1	88
	0,1	56
	0,01	20

Beispiel 4

Bestimmung der Epitopüberlappung von Antikörpern gegen Phospholipase A₂

Zum Nachweis der Epitopüberlappung eines Antikörpers mit dem monoklonalen Antikörper DSM ACC 2025 oder DSM ACC2026 wird ein kompetitiver Enzymimmunoassay durchgeführt.

Dazu wird Phospholipase A₂ zunächst mit D-Biotinyl-ε-amidocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester (Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 10 08 960) gemäß Angaben des Herstellers biotinyliert. Von diesem biotinylierten Antigen werden 300 ng in einem Volumen von 100 µl PBS durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur an eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte (Herstellung nach EP-A 03 44 578) gebunden. Nach viermaligem Waschen mit PBS/0,05% Tween 20 wird 90 Minuten bei Raumtemperatur simultan inkubiert mit dem monoklonalen Antikörper DSM ACC2025 bzw. DSM ACC2026, der mit Peroxidase markiert wurde (Endkonzentration 250 mU/ml) und dem zu beurteilenden Antikörper. Nach erneutem viermaligem Waschen mit PBS/0,05% Tween 20 wird mit der Enzymsubstratlösung ABTS® in Natriumperborat enthaltendem Puffer (s. Beispiel 2) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Extinktion bei 405 nm als Maß für die Menge des gebundenen POD-markierten monoklonalen Antikörpers DSM ACC2025 bzw. DSM ACC2026 gemessen. Dieser Wert wird verglichen mit der Extinktion, die erhalten wird, bei Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper DSM ACC2025 bzw. DSM ACC2026 allein. Wenn bis zum einem 10⁵-fachen Überschuß an zu beurteilendem Antikörper gegenüber dem monoklonalen Antikörper DSM ACC2025 bzw. DSM ACC2026 als Enzymkonjugat (250 mU/ml) mindestens 50% Konkurrenz zu erkennen sind, liegt eine Epitopüberlappung vor.

Patentansprüche

1. Monoklonaler Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A₂, der bei einer Konzentration von weniger als 10 µg/ml eine mindestens 50%ige Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirkt.
2. Monoklonaler Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A₂, der bei einer Konzentration von weniger als 1 µg/ml eine mindestens 50%ige Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirkt.
3. Monoklonaler Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A₂, der bei einer Konzentration von weniger als 100 ng/ml eine mindestens 50%ige Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirkt.
4. Monoklonaler Antikörper gegen die Typ-I-Phospholipase A₂, der in äquivalenter Weise an die Typ-I-Phospholipase A₂ bindefähig ist, wie ein aus den Zelllinien DSM ACC2026 und/oder DSM ACC2025 erhältlicher monoklonaler Antikörper.
5. Monoklonaler Antikörper gegen die Typ-I-Phospholipase A₂, erhältlich aus der Zelllinie DSM ACC2026.
6. Monoklonaler Antikörper gegen die Typ-I-Phospholipase A₂, erhältlich aus der Zelllinie DSM ACC2025.
7. Zelllinie DSM ACC2026.
8. Zelllinie DSM ACC2025.
9. Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen die Typ-I-Phospholipase A₂, der bei einer Konzentration von weniger als 10 µg/ml eine mindestens 50%ige Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirkt, bei dem man mit gereinigter Phospholipase A₂ immunisiert und nach Immortalisieren von Milzzellen der immunisierten Tiere diejenigen immortalisierten Zellen kloniert, deren Kulturüberstand eine entsprechende Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirkt und Isolierung der von diesen Klonen produzierten monoklonalen Antikörpern nach bekannten Verfahren.
10. Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen die Typ-I-Phospholipase A₂, der bei einer Konzentration von weniger als 1 µg/ml eine mindestens 50%ige Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirkt, bei dem man mit gereinigter Phospholipase A₂ immunisiert und nach Immortalisieren von Milzzellen der immunisierten Tiere diejenigen immortalisierten Zellen kloniert, deren Kulturüberstand eine entsprechende Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirkt und Isolierung der von diesen Klonen produzierten monoklonalen Antikörpern nach bekannten Verfahren.
11. Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen die Typ-I-Phospholipase A₂, der bei einer Konzentration von weniger als 100 ng/ml eine mindestens 50%ige Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirkt, bei dem man mit gereinigter Phospholipase A₂ immunisiert und nach Immortalisieren von Milzzellen der immunisierten Tiere diejenigen immortalisierten Zellen kloniert, deren Kulturüberstand eine entsprechende Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirkt und Isolierung der von diesen Klonen produzierten monoklonalen Antikörpern nach bekannten Ver-

fahren.

12. Verwendung eines monoklonalen Antikörpers
gemäß Anspruch 1—6 oder durch ein Verfahren
gemäß Anspruch 9—11 erhältlichen monoklonalen
Antikörpers oder eines funktionellen Fragments
dieses Antikörpers zur Herstellung eines Thera-
peutikums, das bei Entzündungserscheinungen,
speziell bei akuter Pankreatitis eingesetzt werden
kann.

13. Pharmazeutische Formulierung, bestehend aus
einem monoklonalen Antikörper gemäß einem der
Ansprüche 1—6 oder einem durch ein Verfahren
gemäß einem der Ansprüche 9—11 erhältlichen
monoklonalen Antikörper oder einem funktionel-
len Fragment dieses Antikörpers gegebenenfalls
zusammen mit den üblichen pharmazeutischen
Träger-, Füll-, Hilfs- und Zusatzstoffen.

14. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeuti-
schen Formulierung gemäß Anspruch 13.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

